

Aus dem
Institut für gerichtliche Medizin der Universität Erlangen
Direktor: Professor Dr. med. et phil. E. Weinig

BEITRAG
ZUR FRAGE DES NACHWEISES
VON THIOBARBITURATEN
IM HARN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen

Vorgelegt
von
Brigitte Arold
aus Nürnberg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548205_0020

Aus dem
Institut für gerichtliche Medizin der Universität Erlangen
Direktor: Professor Dr. med. et phil. E. Weinig

BEITRAG
ZUR FRAGE DES NACHWEISES
VON THIOBARBITURATEN
IM HARN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu Erlangen

Vorgelegt
von
Brigitte Arold
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen.

Dekan: Professor Dr. C. K o r t h
Referent: Professor Dr. Dr. E. W e i n i g
Tag der mündlichen Prüfung: 12.4.1956



Disposition

	<u>Seite</u>
A. Einleitung	5
B. Hauptteil	5
I. Allgemeines über Thiobarbiturate	5
a) Historisches	5
b) Klinische Anwendung heute	7
c) Pharmakologie	9
d) Biochemisches Verhalten im Organismus	10
II. Nachweis von Thiopental im Organismus	13
a) Nachweismöglichkeiten der Reinsubstanz	13
b) Nachweis im Organismus	17
III. Eigene Untersuchungen	19
a) Versuche mit Reinsubstanz und nach Zusatz zu Leberlösung	19
b) Versuche mit Harn nach Trapanal-Aufnahme	22
c) Per-Abrodil-Ausfällung	22
d) Extraktionsverfahren	23
e) Isolierung (Chromatogramm)	24
f) Identifizierung	24
C. Epikrise	28
I. Auswertung der Ergebnisse	28
II. Zusammenfassung	29
Literaturangaben	32
Lebenslauf	35

A. Einleitung:

Soweit wir die Literatur überblicken sind Vergiftungen mit Thiobarbituraten in Deutschland noch nicht beschrieben worden. Auch in Amerika, wo die Mittel bereits viel länger und ausgedehnter Verwendung finden (Brodie, Mark, Papper, Lief, Bernstein und Rovenstine 1950; Brodie 1952; Brodie, Bernstein und Mark 1952), sind uns keine Vergiftungen bekannt geworden. Der Nachweis erscheint toxikologisch besonders wichtig deshalb, weil Mittel wie Thiobarbiturate neuerdings vor allem in Kombination mit anderen Schlaf- und Narkosemitteln gebraucht werden, wobei nicht nur Summation, sondern auch Potenzierung der Wirkung in Frage kommt. Aus diesen Gegebenheiten heraus ist es erforderlich, einen exakten Nachweis für Thiobarbiturate in Körperorganen und Körperausscheidungen zu besitzen.

Wir haben es uns zur Aufgabe gemacht, die Ausscheidung von Thiopental im Harn zu prüfen und einen sicheren Nachweis zu finden, da uns im deutsch-sprachigen Schrifttum keine entsprechende Arbeit bekannt ist. Die einzige in der Literatur angegebene Methode (Spektrophotometrie, Brodie 1950) entspricht unseres Erachtens nicht den Anforderungen, die in forensischen Fällen hinsichtlich der Spezifität zu stellen sind (s.Seite 17).

B. Hauptteil:

I. Allgemeines über Thiobarbiturate

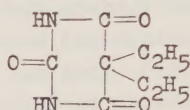
a) Historisches

Schwefelsubstituierte Barbiturate wurden in Deutschland als Kurz-narkotika zur intravenösen Anwendung bisher noch verhältnismäßig wenig gebraucht. In Amerika vor allem und auch in England sind sie bereits seit vielen Jahren eingeführt. Daher existieren auch viele Arbeiten über Anwendung, Wirkungsweise, Pharmakologie und Toxikologie von Pentothal bzw. Thiopental, dem bekanntesten amerikanischen Präparat in der angloamerikanischen Literatur.

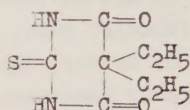
Bereits 1903 wurden Versuche mit Thiobarbituraten gemacht. Fischer und von Mering fanden, daß durch Änderung der 5-C- und 2-C-Substituenten am Malonylharnstoffring große Unterschiede in der hypnotischen Wirkung eintreten können. Damals erkannte man auch die großen Vorteile des Veronal und versuchte die pharmakologische Wirkung

dieser Diäthylbarbitursäure durch Substitution des Sauerstoff-Atoms am Grundskelett durch ein Schwefelatom günstig zu beeinflussen.

Fischer und von Mering bildeten die dem Veronal entsprechende Thiobarbitursäure.



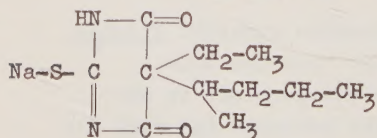
Diäthylmalonylsäure=
Veronal



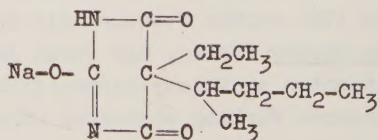
Diäthylthiomalonylsäure

Von dieser Diäthylthiobarbitursäure wurde 1 g einem 7 kg schweren Hund oral verabreicht. Eine Stunde später schlief er tief, reagierte auf keinerlei Reize und starb nach 8 Stunden. Trotz dieser unerfreulichen pharmakologischen Anzeichen führten Tabern und Volwiler 1935 kritische und systematische Untersuchungen der höheren alkylsubstituierten Thiobarbiturate durch. Sie zeigten, daß einige Verbindungen dieser Gruppe von pharmakologischer und klinischer Seite betrachtet, wirklich starke Narkotika von sehr kurzer Wirkungsdauer sind. Im allgemeinen stiegen die Thiohomologen der disubstituierten Barbitursäuren, die vorher als ganz brauchbare Narkotika angesehen wurden, noch in ihrer Wirksamkeit und zeigten sich bei Anwendung aktiver als die entsprechenden Sauerstoffhomologen. Die Ergebnisse waren auffallend. Nach der intravenösen Injektion trat der Schlaf sofort ein, die chirurgische Anästhesie ergab sich innerhalb 5 Minuten und 20 Minuten später standen die Tiere beinahe normal wieder auf den Beinen.

Das erste in die Praxis eingeführte Thiobarbiturat ist die von Tabern und Volwiler synthetisierte 5-Äthyl 5-(1-Methyl-Butyl)-Thiobarbitursäure, bekannt unter dem Namen Pentothal, Thiopental und Nesdonal. In Deutschland wird dieses Präparat unter der Handelsbezeichnung Trapanal hergestellt. Das dem Trapanal entsprechende Sauerstoffhomologe ist das Pentobarbital oder Nembutal.



Trapanal



Nembutal

Weitere Thiobarbiturate deutscher Herkunft sind Baytinal, Inaktin und Thiogenal, die sich lediglich in der Alkylseitenkette des 5-C-Atoms unterscheiden.

b) Klinische Anwendung heute

Eine ausgedehnte Anwendung finden Thiobarbiturate bei kurzdauernden diagnostischen und operativen Eingriffen als sogenannte Kurznarkotika. Nach einer Prämedikation von Atropin oder ähnlichen Medikamenten werden für eine Narkosedauer von 10-15 Minuten durchschnittlich 0,5-1 g benötigt. Die Dosierung muß dem Zustand und der Reaktionsweise des Patienten angepaßt werden. Zur Verlängerung einer Thiobarbiturat-Narkose ist die Kombination Lachgas / Sauerstoff vorteilhaft gewählt, da sich eine geradezu schlagartige Beendigung der Narkose herbeiführen läßt. Wird zu einem Eingriff eine völlige Muskelereschlaffung gewünscht, so kann dies durch Muskelrelaxantien in Thiobarbituratnarkose unter künstlicher Beatmung erreicht werden. Der Vorteil liegt darin, daß die Patienten rascher erwachen als bei den bekannten N-methylierten Barbituraten und daß keine postnarkotische Erregung oder unangenehme Nachwirkung eintritt.

Lüdeke berichtet über 95 Pentothal-Natrium-Narkosen. Die Blutdruckkontrolle zeigte immer einen geringen Abfall des systolischen und des diastolischen Druckes. Gleichzeitig mit der Blutdruckerniedrigung trat eine Verflachung der Atmung ein und bei jedem vierten Kranken ein kurzdauernder Atemstillstand. Bei Patienten jenseits des 60. Lebensjahres bemerkte Lüdeke häufiger vorübergehend Atemstillstand als bei jüngeren Patienten.

Füsslein, Kaniak und Wiemers verabreichten zur Verlängerung von Thiogenal-Narkosen bis zu 2 g und stellten fest, daß die Patienten nicht schneller erwachten als nach verlängerten Narkosen mit anderen Barbituraten. Es sollte also über eine 1 g-Gabe nicht hinausgegangen werden, da dann mit einer gewissen Kumulation zu rechnen ist.

Auch Brodie und Keele warnen vor der Anwendung der Thiobarbiturate zur Erzielung von Langnarkosen, wie vor wiederholten Narkosen innerhalb kurzer Zeit, da eine Kumulation zu erwarten ist.

Von nachteiligen Wirkungen des Pentothal-Natrium war bisher wenig bekannt geworden. Körner untersuchte diese Thiobarbitursäure und die gebräuchlichsten N-methylierten Barbitursäurederivate vergleichend

miteinander im Tierexperiment. Bei Ratten und Meerschweinchen wurde das Verhalten gegenüber der chronischen Zufuhr narkotisch wirkender Dosen von Evipan-Natrium, Narconumal, Eunarcon und Pentothal-Natrium geprüft. Es wurde mit einer Ausgangsdosis von 2x50 mg/kg Körpergewicht begonnen. Zur weiteren Erzielung eines narkotischen Effektes wurde bis zum 37. Tag auf 3 x täglich 500 mg/kg Körpergewicht gesteigert. Für jedes Präparat standen 20 Ratten zur Verfügung.

Beim Evipan-Natrium lebten nach 27 Tagen noch 90 % aller Tiere. Am 37. Tag waren alle Tiere tot.

Im Gegensatz dazu waren beim Pentothal-Natrium schon am 15. Tag alle Tiere bis auf eines tot. Die Werte für Narconumal und Eunarcon liegen zwischen diesen beiden Zeitpunkten.

In einem weiteren Versuch untersuchten Körner und Enders die Leber der nach Pentothal-Narkose gestorbenen Ratten und Meerschweinchen. Das histologische Ergebnis zeigte eine zentrale Verfettung der Leberläppchen. Bei Vorbehandlung der Ratten mit methioninsaurem Cholin wurde die Überlebenszeit der mit Pentothal vergifteten Ratten heraufgesetzt.

Hunden wurde von Walton, Saldamando und Egner 3 Wochen lang 2-3 mal täglich 20 mg/kg Körpergewicht injiziert. Die Leberfunktion, welche durch den Serumbilirubinspiegel und den Prothrombintest bestimmt wurde, war erniedrigt, stellte sich aber 4 Wochen nach der letzten Pentothal-Injektion wieder vollkommen normal ein. Sauerstoff-Inhalation während der Pentothal-Narkose hatte keinen Einfluß auf die Leberfunktionsproben.

Um die Verträglichkeit von Thiobarbituraten zu steigern, enthält das von der Firma Merck hergestellte Thiogenal den Methylthioäthylrest des Methionins, von dem man sich eine günstige Wirkung bei den Entgiftungsprozessen in der Leber verspricht.

Mit Chloroform hervorgerufene experimentelle Leberschädigung wie dies Dundée durchführte, verlängert die Pentothal-Narkosedauer, was den klinischen Beobachtungen entspricht. Ebenso berichtet Shideman, daß Patienten mit schweren Leberschädigungen mit wesentlich geringeren Mengen Pentothal auskommen als Menschen mit gesunder Leber. Leichte Leberfunktionsstörungen sollen die Pentothal-Toleranz nicht wesentlich ändern. Demnach muß die Leber als Hauptumwandlungsort der Thiobarbiturate angesehen werden.

Keele stellte deshalb die einfache Regel auf, daß bei Leberschäden die sogenannten klassischen Barbiturate am Platze sind, da diese durch die Niere ausgeschieden werden; bei Störungen der Nierentätigkeit dagegen sollen die schwefelsubstituierten Barbiturate, die durch die Leber unschädlich gemacht werden, Verwendung finden.

Hinweise von Hewer ließen vermuten, daß die Vorbehandlung mit Sulfonamiden die Toxizität des Pentothal-Natrium, bedingt durch seinen Schwefelgehalt, steigern könnte.

Weitere Untersuchungen von Körner nach der oben beschriebenen Injektionsserie mit gleichzeitiger Verabreichung von Antibiotica ergaben eine deutlich sichtbare Zunahme der Letalität bei den Tieren, die statt Evipan-Natrium, Pentothal-Natrium erhielten.

c) Pharmakologie:

Über die Pharmakologie des Thiopental unterrichtet uns eine Arbeit von Nieschulz und im übrigen steht uns nur ausländische Literatur zur Verfügung.

Bei den von Nieschulz untersuchten Thiobarbitursäureabkömmlingen ist vor allem das Thiopental von Interesse. Nieschulz beobachtete das Erlöschen des Cornealreflexes und den Eintritt des Atemstillstandes bei intravenöser Dauerinfusion an 25 Kaninchen. Dabei gilt als Dauerinfusion 5 mg/kg/min. in 0,7 ml gelöst. Die Kontrolle des Cornealreflexes wird mit Reizhaaren durchgeführt. Kein Reflex auf 6 Reize wird als beginnendes Erlöschen bezeichnet. Als Beginn des Atemstillstandes wurde der Ausfall der Atembewegungen für 15 Sekunden angenommen.

Erlöschen des Cornealreflexes: nach 8,2-8,10 mg/kg

Atemstillstand: nach 30 -35,2 mg/kg

Die Mortalität betrug 12 %.

Zur Feststellung der Kumulationsneigung verabreichte Nieschulz 10 Katzen und Kaninchen alle 10 Minuten eine intravenöse Injektion, und zwar die Dosis, die zum Erlöschen des Cornealreflexes führt. Die pro Injektion benötigte Dosis betrug 8,0 mg/kg. Nach durchschnittlich 9,5 Injektionen waren die Tiere tot.

d) Biochemisches Verhalten im Organismus

Da Barbiturate nicht flüchtige Narkotika sind, können sie nicht durch das respiratorische Epithel ausgeschieden werden. Ihre Wirkungsdauer wird also bestimmt sein durch den Zeitabschnitt bis zu ihrer Umwandlung bzw. bis zu ihrer Elimination. Tierversuche geben über die Verteilung des Thiopental im Organismus Aufschluß. Brodie, Bernstein und Mark beobachteten an Hunden nach Thiopental-Injektion von 25 mg/kg, daß die Konzentrationen in Plasma und Leber sofort nach Verabreichung des Narkotikums am höchsten sind, während jene im Muskel noch für kurze Zeit steigen. Leber, Muskel und Plasma-Konzentration fallen dann nach ungefähr einer Stunde schnell und parallel und nehmen für die nächsten 2-3 Stunden langsamer ab. Die Konzentrationen im Fett, welche zuerst negativ waren, stiegen nach der ersten Stunde schnell, dann allmählich an und erreichten nach 3-6 Stunden ein Maximum, um dann wieder zu sinken. Eine gleichmäßige Konzentration in den verschiedenen Körperfettdepots wird erst nach einer größeren Zeitspanne, nämlich nach 48 Stunden, erreicht. Es wäre möglich, daß Unterschiede in der Blutzirkulation den Aufschub einer gleichmäßigen Thiopental-Konzentration erklären könnten. Die Konzentrationen im Fett können Werte erreichen, die 10-15 mal gegenüber denjenigen des Plasmas und anderer Gewebe höher sind.

Ein Vergleich der Thiopental-Konzentration im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit zeigt, daß der Liquorspiegel zuerst niedrig war, dann aber rasch anstieg, um fast die Höhe der Plasma-Konzentration zu erreichen. Danach fielen beide schnell ab, da das Anästhetikum das Zentralnervensystem verläßt, um sich im Fett abzulagern. Es ist wahrscheinlich, daß das anfängliche Zurückbleiben der Cerebrospinalflüssigkeits-Konzentration durch die Zeit bedingt ist, die das Medikament benötigt, um die große Zisterne zu erreichen, nachdem es die Blut-Liquorschranke gekreuzt hat. Obgleich das Gehirn einen relativ hohen Fettgehalt hat, ist die Thiopental-Konzentration in diesem Gewebe nur um geringes höher als im Plasma, da der größte Teil des Lipoids im Gehirn nicht Neutralfett ist, sondern aus Phosphorlipoiden und Cholesterin besteht. Thiopental ist ziemlich gleichmäßig auf die verschiedenen Hirngebiete verteilt, ähnlich wie es für Nembutal 1950 von Maynert und van Dyke berichtet worden ist.

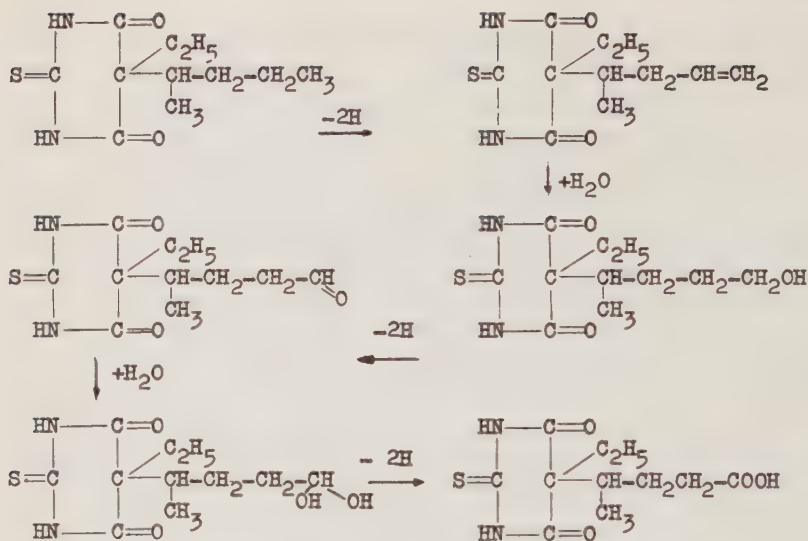
Daraus ergibt sich, daß die scheinbar kurze Wirkung des Pentothal

offenbar auf die Verteilung des Narkotikums im Körper, nicht aber auf den raschen Abbau zurückzuführen ist.

Eine bessere Übersicht über die Verteilungs- bzw. Umlagerungsgeschwindigkeit ermöglicht Brodie, indem er eine größere Dosis von Pentothal verabreicht. Bei 2 g-Gaben verschwindet das Thiopental nach 2 Stunden aus dem Plasma. Die Konzentration fällt um 10-15 % pro Stunde und nur minimale Beträge werden im Urin ausgeschieden. Bei 4 g-Gaben schliefen die Patienten 4-6 Stunden und nach Bewußtseinsrückkehr trat eine postnarkotische Somnolenz von 10 Stunden ein. Die langdauernden Wirkungen bei nacheinander verabreichten Dosen werden durch den langsamen Abfall der Plasma-Konzentration infolge der relativen Stabilität in vivo erklärt.

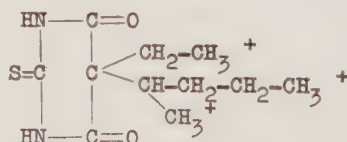
Anhand der Gesamtschwefelausscheidung gelangten Taylor, Richards und Tabern zu einer Erkenntnis über die Höhe der Pentothal-Elimination. Ratten wurde 40 mg/kg von S^{35} markiertem Pentothal injiziert und der ausgeschiedene radioaktive Schwefel chromatographisch bestimmt. In den ersten 24 Stunden war die Ausscheidung von S^{35} Schwefel mit 67 % sehr schnell. Erst nach 4 Tagen konnte ein Gesamtbetrag von 89,5 % des radioaktiven Schwefels aus dem Urin, dem Stuhl und dem Tierleichenam gewonnen werden. Der fehlende Rest wird auf Verluste durch die zahlreichen Analysen zurückgeführt.

Brodie gibt in seinen Berichten an, daß etwa 0,3 % des unveränderten Thiopental im Urin ausgeschieden werden. Daneben fand Brodie im Urin eine Substanz, die zwar eine identische Absorptionskurve mit Thiopental aufweist, beim Hund und bei der Maus aber keinerlei narkotisierende Wirkung mehr zeigt. Brodie entdeckte durch Molekulargewichtsbestimmung und elektrometrische Titration, daß die Substanz außer der schwachen Säuregruppe wie im Thiopental noch eine starke von der Art einer Carboxylgruppe enthält. Die mit Thiopental identische Absorptionskurve läßt erkennen, daß die Veränderung nicht in einer Aufspaltung des Barbitusäurerings liegen kann. Die Titration, die Molekulargewichtsbestimmung und die Elementaranalyse sprechen dafür, daß die Veränderung durch Oxydation einer der Methylgruppen in den Alkylseitenketten zur Carboxylgruppe wechselt. Brodie gibt folgende Umwandlung an und bezeichnet das Produkt als Pentothal-Carboxylsäure.



Pentothal-Carboxylsäure

Hierbei ist aber noch nicht festgestellt, welche Stellung die Carboxylgruppe einnimmt und es sind die drei mit einem Kreuz bezeichneten Stellungen möglich.



Wie Brodie über Pentothal, so berichten Maynert und Dawson über Pentobarbital, dem Sauerstoffhomologen des Pentothal, daß es ebenfalls durch Oxydation der Seitenkette entgiftet wird und nicht wie von Shonle 1933 berichtet vollkommen in Kohlendioxyd, Ammoniak und Harnstoff umgewandelt wird. Maynert gibt an, daß die Umwandlungsprodukte Diastereoisomere der 5-Äthyl-5-(3-Hydroxyl 1-Methyl-Butyl)-Barbitursäure, also Alkohole sind, die bei Mäusen auch nach Verabreichung von höheren Dosen keine Aktivität mehr besitzen. Hunden wurden narkotisierende Dosen von markiertem Pentobarbital verabreicht und Maynert sah eine Ausscheidung von 33-36 % des linksdrehenden und 15 % des rechtsdrehenden Alkohols. Es wird vermutet, daß weitere Stoffwechselprodukte Glucuronsäureverbindungen sind, die jedoch nicht extrahierbar waren.

Die Ausscheidungsmenge der Pentothal-Carboxylsäure bestimmte Brodie nach Gaben von steigenden Thiopental-Dosen. Die Gesamtausscheidung der Pentothal-Carboxylsäure beträgt bei Gaben von 2 g Pentothal 10 % und bei 4 g bis zu 25 % mit dem Harn. Ob die zunehmende Elimination der Pentothal-Carboxylsäure im Urin mit Zunahme der gegebenen Thiopental-Menge ein Sättigungssystem anzeigt, wonach mehr Säure-derivate aus Thiopental umgewandelt werden oder auf der Sättigung eines Reabsorptionsmechanismus in der Niere beruht, wurde nicht festgestellt. (Brodie)

Taylor, Richards und Tabern, die Ausscheidungsversuche mit S^{35} Pentothal machten, gaben an, daß 12-16 % des Umwandlungsproduktes in den ersten 24 Stunden durch die Niere eliminiert werden, was etwa mit den 10-15 % übereinstimmt, die Brodie und Keele für den stündlichen Abbau von Thiopental angeben.

Durch Verabreichung anderer schwefelhaltiger Substanzen erhielten Taylor, Richards und Tabern Vergleiche für weitere Umwandlungsprodukte von S^{35} -Pentothal. Es ergab sich, daß im Urin von Ratten und Affen nach Einspritzung von S^{35} Pentothal der radioaktive Schwefel zum Teil in normalen Stoffwechselprodukten eingebaut sein kann, wie z.B. in Taurin, Thiocyanat und den Sulfateestern von o-Kresol, p-Kresol sowie Phenol, jedoch in sehr kleinen Mengen. Hierbei liegt der Gedanke nahe, daß die Umkehrung eines Thiobarbiturates in ein Barbiturat eintreten müßte. Kozelka und Haine (1939) konnten bei parenteraler Verabreichung von Thiobarbituraten in den Geweben von Hunden und Kaninchen die dazugehörigen Sauerstoffhomologen nicht nachweisen. Bush und Butler fanden nach Injektion von Thiopental bei Hunden kein Pentobarbital im Urin. Gad (1942) gab Kaninchen Diäthylthiobarbitursäure oral; diese wurde zum Teil als Diäthylbarbitursäure ausgeschieden. Dies läßt erkennen, daß die parenterale Injektion keine Umwandlung von Thiobarbituraten in Barbiturate ermöglicht.

II. Nachweis von Thiopental im Organismus

a) Nachweismöglichkeiten der Reinsubstanz

Zur Identifizierung eines Stoffes stehen meist mehrere Verfahren zur Verfügung. Da es sich jedoch häufig, besonders in der forensischen Medizin, um das Auffinden von zum Teil nur in Spuren vorhandenen Medikamenten und Giftstoffen handelt, sind vor allem die Nachweis-

methoden von Bedeutung, welche unter diesen Umständen noch genügende Empfindlichkeit aufweisen. Da bei Spurenanalysen die empfindlichen Methoden häufig nicht spezifisch sind, müssen dann mehrere Untersuchungen nach verschiedenen, voneinander unabhängigen Methoden angewendet werden, deren positives Gesamtergebnis dann eine genügende Sicherheit des Nachweises liefern kann.

Nachweis des organisch gebundenen Schwefels: Grote beschrieb 1931 eine neue Farbreaktion für lösliche organische Schwefelverbindungen. Eine frisch hergestellte wässrige Lösung des lichtempfindlichen Natriumnitroprussid $\text{Na}_2(\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO})\text{H}_2\text{O}$ gibt in Gegenwart von Natriumbikarbonat mit Thioharnstoff im Licht eine blaue und mit Mercaptanen eine purpurrote Färbung.

Nach Hofmann gibt das aus Nitroprussidnatrium mit Hydroxylamin gebildete Natriumaquoferrocyanid $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}$ weder mit Mercaptanen noch mit Thioharnstoffen Färbungen. Jedoch das durch Oxydation daraus entstehende Natriumaquoferriicyanid $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{H}_2\text{O}$, welches in Grote's Reagens enthalten ist, gibt wieder Reaktionen.

Herstellung von Grote's Reagens:

0,5 g Hydroxylaminhydrochlorid,
0,5 g Nitroprussidnatrium (in 10 ccm kaltem Wasser lösen),
1,0 g Natriumbikarbonat.

Nach Aufhören der Gasentwicklung 2 Tropfen Brom zugeben, das überschüssige Brom verjagen, filtrieren und auf 25 ccm auffüllen. Diese Lösung ist etwa 2 Wochen haltbar.

Über dieses Reagens schreibt Sonsbeek, daß es die Möglichkeit gibt zwischen C=S-Radikalen auf der einen Seite, C-S-H- und C-S-S-C-Strukturen auf der anderen Seite zu unterscheiden. Mit C=S-Bindungen gibt Grote's Reagens eine grüne oder blaue Farbe und eine purpurrote mit C-S-H- und C-S-S-C-Gruppen.

Sonsbeek erkannte, daß die Zugabe von Brom zu Grote's Reagens nicht unbedingt erforderlich ist, um spezifische Färbungen zu erhalten und nannte das dahingehend geänderte Grote Reagens, Grote's Lösung.

Herstellung dieser Lösung:

In 25 ccm Aqua dest. werden 2 g Hydroxylaminhydrochlorid und 7,2 ccm 4 n Natronlauge gelöst. Bei Zugabe von 2 g Nitroprussidnatrium zu dieser Mischung wird Stickstoff frei; hierauf wird mit Aqua dest. auf 100 ccm aufgefüllt und filtriert. Diese braungelbe Lösung gibt

beim Stehen weniger Niederschlag als das Original Grote Reagens, ist aber auch nur 2 Wochen haltbar.

Zudem fand Sonsbeek noch, daß eigenartigerweise bei Verwendung von Grote's Reagens und Natriumnitroprussid für Thiopental-Natrium-Lösungen die Reaktionen negativ waren. Grote's Lösung jedoch gibt ebenso wie Aquoprussidnatrium eine wundervolle rote Farbe bei pH-Werten zwischen 4. und 8. Aquoprussidnatrium, kann als das reagierende Agens in Grote's Lösung angesehen werden. Grote's Lösung ist ein gutes Nachweis-Reagens für Thiobarbiturate im besonderen für Thiopental. Raventoš gibt Grote's Reagens zur Sichtbarmachung von Thiobarbituraten auf Chromatogrammen an.

Das von Roux eingeführte Reagens, welches durch Behandeln von alkalischer Natriumnitroprussidlösung mit Kaliumpermanganat hergestellt wird, gibt mit Thiopental dieselben Reaktionen wie Grote's Lösung. Sonsbeek nimmt an, daß Aquoprussidnatrium auch bei dieser Reaktion eine bedeutende Rolle spielt. Esposito Vitolo hat durch Untersuchungen gezeigt, daß Roux's Reagens zur Charakterisierung von Sulfonen und Sulfonamiden dienen kann. Diese Eigenschaft jedoch dürfte sich beim Nachweis von Thiopental störend auswirken.

Eine andere Art der quantitativen Bestimmung gibt Laubie an. Zu einer wässrigen Thiobarbitursäurelösung fügt man 0,1 ccm einer 5%igen Nitroprussidnatriumlösung und 0,1 ccm einer n/10 Natronlauge zu und läßt dies stehen. Gibt man nach einer Stunde zu der orangen Lösung 0,2 ccm Salzsäure, so tritt bei positiver Reaktion eine Rotfärbung ein, die sich mit Amylalkohol wieder entfärbt.

Auch mit dem von Hoffman und Wilkens angegebenen Verfahren zum Nachweis des Schwefels in Sulfonamiden kann man Thiobarbiturate identifizieren. Da aber zu einem positiven Ausfall der Reaktion 50 mg Substanz notwendig sind, ist es als Spurennachweis ungeeignet.

Awe beschreibt eine Methode zum Nachweis des zweiwertigen Schwefels in organischen Arzneimitteln, welche auf der Jodazidreaktion beruht und ebenfalls 50 mg pro Reaktion erfordert.

Turkevich und Makukha führen einige Möglichkeiten an, um Rhodanine, Thiazolidine und Pseudohydantoine sowie Verbindungen, welche die Gruppe C=S, C-S-C- und C-S-S-C- enthalten, nachzuweisen. Die Grundlage des Untersuchungsvorganges ist folgende:

5 mg der Substanz werden 5 Minuten in n/10 Natronlauge gekocht,

abgekühlt, mit Salzsäure angesäuert und 2 Tropfen von Eisenchlorid Kupfersulfat, Bleiazetat oder Natriumnitroprussidlösung werden zugegeben. Letzteres ist für Pentothal das bestimmende Reagens.

Einige maßanalytische Methoden, mit denen 5,5-Dialkylderivate der Thiobarbitursäure mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden können, stehen durch die Berichte von Wojahn zur Verfügung. Bei der Hypojodidreaktion wird der Schwefel der C=S-Gruppe zu SO_4 oxydiert, wobei pro Mol 8 Jodäquivalente verbraucht werden. Eine nach dem gleichen Schema verlaufende Oxydation wird durch Titration mit 0,1 n Kaliumbromat in mineralsaurer Lösung erreicht. Bei dem dritten, dem argentometrischen Verfahren werden die zu untersuchenden Präparate mit 0,1n Silbernitrat versetzt und der Silberüberschuß rhodanometrisch zurücktitriert. Hierbei unterscheiden sich die 5,5-Thiobarbitursäuren durch ihre schwer löslichen Silbersalze von ihren sauerstoffhaltigen Homologen. Für die Reaktionen werden jeweils 50-100 mg benötigt, weshalb auch dieses Vorgehen toxikologisch ungeeignet ist.

Da viele Arzneimittel organisch gebundenen Schwefel enthalten, ist mit einem Kriterium für diesen allein kein Nachweis für Thiobarbiturate geliefert.

Wie zur Bestimmung des Schwefels stehen auch für die Barbitursäure mehrere bereits genauer beschriebene Methoden zur Verfügung (Fahr). Die wichtigsten Farbreaktionen sind die von Zwicker mit Pyridin-Kupfersulfat und die von Bodendorf mit Cobaltnitrat und Lauge bzw. die Modifizierung nach Oettel mit Cobaltazetat und Lauge in wasserfreier Lösung. Barbiturate färben sich mit Zwicker's Reagens violett, Thiobarbiturate nach Heise und Kimbel grün; blaugrün oder gelb. Mohrschulz zeigte, daß Sulfonamide mit Zwicker's Reagenz Blaufärbung ergeben, ausgenommen Badional nach Heise und Kimbel, das mit grüner Farbe reagiert. Pfeil, der zum Nachweis von Barbituraten auf chromatographischem Papier die Bodendorf'sche Reaktion mit Cobaltnitrat anwendet, erzielt in einem ammoniakgesättigten Gemisch aus Amylalkohol-Butylalkohol 1:1 als Lösungsmittel bei bestimmten R_F -Werten violette Flecken.

Als weiteres wichtiges Identifizierungsmerkmal eines Stoffes wird das Aussehen und der Bau von Kristallsublimaten, sowie die Schmelzpunkt- und Mischschmelzpunktbestimmung anerkannt. Die Anwendung der Schwermetallalkalihalogen-Komplexreagentien hat sich bei der Unter-

suchung von mehreren Handelspräparaten der Thiobarbitursäurereihe nicht bewährt. (Fahr)

Es wird angegeben, daß zur Bestimmung der Barbiturate und Thiobarbiturate die chromatographische Methode zuerst von Raventoš angewendet wurde. Papierchromatographisch gelang es Raventoš die Barbiturate von den Thiobarbituraten zu unterscheiden, nach Sichtbarmachung mit Kupfersulfat und Pyridin, mit Grote's Reagens und mit ultravioletttem Licht. Außerdem wurden Quecksilbernitrat, Quecksilbersulfat, Silberazetat und Kaliumpermanganat verwendet, die aber zwischen Barbituraten und Thiobarbituraten keine Unterscheidung zeigten. Die angeführten R_F -Werte zur Unterscheidung der verschiedenen Barbiturate und Thiobarbiturate sind kritisch zu betrachten, da die meisten R_F -Werte fast in gleicher Höhe liegen.

b) Nachweis im Organismus:

Für die Bestimmung von Pentothal bzw. seines Umwandlungsproduktes im Organismus steht die von Brodie, Lester, Mark, Papper, Lief, Bernstein und Rovenstine ausgearbeitete Methode zur Verfügung. Diese beruht auf der Lichtabsorption des Pentothal im ultravioletten Bereich. Das sehr empfindliche Verfahren liefert fast identische ultraviolett-spektrophotometrische Absorptionskurven von Pentothal und dem aus biologischem Material gewonnenen Umwandlungsprodukt (s. Abb. 1).

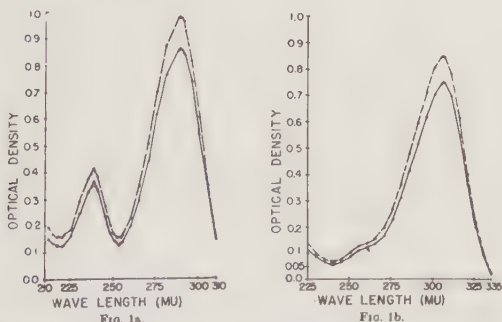


FIG. 1. THE ABSORPTION SPECTRA OF PENTOTHAL (BROKEN LINE) AND PENTOTHAL CARBOXYLIC ACID (SOLID LINE)

(Cell thickness = 1 cm)

Fig. 1a. Concentrations of 10 microgm. per cc. in 0.1 N HCl.

Fig. 1b. Concentrations of 7.3 microgm. per cc. in 0.1 N NaOH.

Dieses spezifische Kriterium ist nicht ganz befriedigend, da eine chemische Änderung in den Alkylradikalen des Pentothal, wie es bei seinem Umwandlungsprodukt, der Pentothal-Carboxylsäure der Fall ist, durch die spektrophotometrische Messung nicht angezeigt wird. Bei dem von Brodie beschriebenen Verfahren wurde reines Pentothal aus angesäuertem biologischen Material durch Extraktion in Petroläther isoliert, wieder ins alkalische zurückgeführt und durch seine Absorption im Ultraviolett bei 305 μ geprüft. Von dem als Lösungsmittel gewählten Petroläther nahm Brodie an, daß er am wenigsten Umwandlungsprodukte extrahiere, was sich auch bestätigte.

Extraktionsverfahren für Pentothal aus Urin: (Brodie)

1-2 ccm Urin werden mit einem gleichen Volumen von 1,5n NaH_2PO_4 und 0,25 g NaCl/ccm in 30 ccm Petroläther gegeben, 5 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. 20 ccm der überstehenden Lösungsphase werden mit 5 ccm 2,5n NaOH 2 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Etwa 3 ccm der Lösungsphase werden in eine Quarz-Kuvette pipettiert und die optische Dichte bei 305 μ im Ultraviolettspektrophotometer bestimmt.

Brodie und Mitarbeiter geben an, daß das Umwandlungsprodukt Pentothal-Carboxylsäure in Petroläther minimal löslich ist, aus dem Urin aber mit Äthylendichlorid gut extrahiert werden kann. Zuvor wird Pentothal aus dem Urin durch Petroläther-Extraktion entfernt.

Extraktionsverfahren für Pentothal-Carboxylsäure aus Urin:

5 ccm Urin und 5 ccm 1,5n NaH_2PO_4 werden mit 40 ccm Petroläther 5 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. 2 ccm des Urinrückstandes werden mit 30 ccm von 1,5%igem Isoamylalkohol enthaltendem Äthylendichlorid 10 Minuten geschüttelt und dann zentrifugiert. 20 ccm der Lösungsmittelphase werden mit 5 ccm 2,5n NaOH 2 Minuten geschüttelt und dann zentrifugiert. 20 ccm der Lösungsmittelphase werden mit 5 ccm 2,5n NaOH 2 Minuten geschüttelt und wiederum zentrifugiert. Von dieser Lösung wird die optische Dichte in einer Quarz-Kuvette bei 305 μ bestimmt.

Der Urin von 10 Patienten, denen 2-4 g Pentothal intravenös injiziert worden war, stand für diese Untersuchungen zur Verfügung. In dem 48-Stunden-Sammelurin konnten nur 0,3 % des unveränderten Pentothal nachgewiesen werden, ein Zeichen dafür, daß Pentothal fast vollständig umgewandelt wird.

Bollmann, Brooks, Flock und Lundy arbeiteten über die Pentothal-Verteilung an weißen Ratten 1. unter Benutzung eines spektrophotometrischen Verfahrens und 2. unter Benutzung eines Pentothal, das ein radioaktives Schwefelatom enthielt, welches nach der Verteilung in den Geweben mit dem Geiger-Müller'schen Zählrohr ausgezählt wurde. Die Ergebnisse beider Methoden zeigten, daß 30 Sekunden nach der Injektion das meiste Pentothal aus dem Blut verschwunden ist und sich ziemlich gleichmäßig auf die Gewebe verteilt hat, wobei der Prozentsatz in Hirn, Muskulatur, Lunge und Intestinum etwas geringer, in Leber und Nieren höher als im Plasma ist.

III. Eigene Untersuchungen

a) Versuche mit Reinsubstanz und nach Zusatz zu Leberlösungen

Um Thiobarbiturate in Körperausscheidungen auffinden und bestimmen zu können, war es notwendig, zuerst einiges über die Eigenschaften der Reinsubstanz zu erfahren.

Als erstes wurden die Sublimationsmöglichkeiten von Baytinal, Inaktin, Thiogenal und Trapanal geprüft. Da diese Anästhetika als Natrium-Salze in den Handel kommen sind sie nicht ohne weiteres sublimierbar, was aber nach Zusatz von verdünnter Salzsäure erreicht wurde.

Es ergaben sich folgende Schmelzpunkte der Sublimate:

Baytinal 143-147°; Inaktin 160-162°; Thiogenal 152-154°.

Sublimation von Trapanal:

94° Punktförmige Kettenbildung.

100° Bildung von feinen Kristallzweigen.

112° Diesen durchscheinenden Kristallen lagern sich Körnchen und Stäbchen auf.

115° Kommaförmiges Auswachsen der Kristalle.

130° Zusätzliche Bildung von Nadel- und Stäbchenformen.

140° Aus den Stäbchen entstanden scherbenartige Kristalle, die unregelmäßig begrenzt waren und spitz ausliefen.

Der Schmelzpunkt liegt bei 153-156°.

Mit einigen der vorher beschriebenen Methoden konnte der Schwefel in den 4 Thiobarbituraten, die zur Untersuchung zur Verfügung standen, nachgewiesen werden.

Für das von Turkevich und Makukha beschriebene Verfahren stellte

sich folgende Versuchsanordnung als geeignet heraus. 4 ccm einer Thiobarbituratlösung werden mit 4 ccm einer n/10 Natronlauge 5 Minuten gekocht und dann abgekühlt. Beim Zufügen von 0,4 ccm einer 5%igen Natriumnitroprussidlösung tritt je nach dem Prozentgehalt der zu untersuchenden Lösung rote bis orange Färbung ein. Ein gleichzeitig mitlaufender Leerversuch, der als Vergleichstest diente, zeigte gelbe Farbe. Für Baytinal, Inaktin und Trapanal erwies sich der Nachweis bis zu 1 mg empfindlich, für Thiogenal bis zu 0,5 mg, was wohl auf dem zusätzlichen Schwefelatom, das die Alkylseitenkette enthält beruhen dürfte.

Mit Grote's Lösung war der Thiobarbiturat-Nachweis noch empfindlicher, und zwar bis zu 0,050 mg, wobei Thiogenal wieder durch eine kräftigere Färbung gegenüber Baytinal, Inaktin und Trapanal hervortrat. In neutraler Lösung waren die Versuchslösungen orangegelb und die des Leerversuches hellgelb. Beim Ansäuern mit Salzsäure entwickelte sich mit Thiobarbiturat eine karminrote bis orange Färbung und im Leerversuch eine grünlich-gelbe. Bei positivem Ausfall ist also die Farbänderung für Thiobarbiturate im sauren Milieu deutlicher sichtbar als im neutralen.

Da sich die papierchromatographische Trennungsmethode für Barbiturate nach Pfeil bewährt hat, war es naheliegend, diese, wie auch von Raventós berichtet, für die Thiobarbituratidentifizierung heranzuziehen. Wir gingen dabei unter Änderung des Lösungsmittelgemisches folgendermaßen vor:

Eine alkoholische Lösung der 4 Thiobarbiturate wurde auf Chromatographierpapier (Schleicher Schüll 2043b) aufgetragen, und zwar wurden je drei Startpunkte mit der gleichen Extraktlösung beschickt. Gearbeitet wurde nach der aufsteigenden Methode (Cramer) unter Verwendung eines Lösungsmittelgemisches aus 100 ccm Butanol, 50 ccm Wasser und 4 ccm Ammoniak.¹⁾ (s.nächste Seite)

Nach etwa 18 Stunden hatten die Chromatogramme eine Steighöhe von etwa 30 cm erreicht; sie wurden im Heißluftstrom getrocknet, jeweils in drei Streifen geschnitten und im ultravioletten Licht betrachtet. Die vier Thiobarbiturate zeigten eine scharf begrenzte, längsovale Absorption bei den gleichen R_f -Werten zwischen 0,80 und 0,85. Bei weiterer Behandlung durch Besprühen von gesättigter methylalkoholischer Cobaltnitratlösung und Aufdampfen von Morpholin (Pfeil) ergab

sich bei R_f 0,80-0,85 für jedes der vier Thiobarbiturate eine rosaviolette Färbung. Beim Besprühen mit Grote's Lösung ergab sich an denselben Stellen, welche im ultravioletten Licht eine Absorption und mit Cobaltnitrat eine rosaviolette Reaktion gegeben hatten, eine kräftige hellrote Farbe, die sich langsam entwickelte und nach einigen Stunden wieder verschwand.

Bei diesem Vorgehen ist zwar eine Identifizierung geringer Mengen von Thiobarbituraten möglich, doch keine Unterscheidung der vier von uns untersuchten Thiobarbiturate, da sie dieselben R_f -Wert ergeben.

In dem Lösungsmittelgemisch nach Jatzkewitz wanderten die Thiobarbiturate bis zur Front, so daß es ungeeignet erschien.

Mit der Zwickerschen Reaktion zeigte Baytinal, Inaktin, Thiogenal und Trapanal eine gelbgrüne Färbung.

Die von Palmieri und Romano angegebene Methode für Thiobarbiturate wurde nicht geprüft, da die R_f -Werte bei 0,9-1,0 liegen und somit keine Unterscheidungsmöglichkeit bieten.²⁾

Es fiel auf, daß beim Stehen von wässrigen Trapanallösungen an der Luft Trübung und Fällung eintritt. Die ausgefallene Substanz wurde

1) Die Eigenart der papierchromatographischen Analyse bringt es mit sich, daß es für jede homologe Reihe von verwandten Substanzen ein bestgeeignetes Lösungsmittelgemisch gibt. In der toxikologischen Praxis muß man jedoch bestrebt sein, mit möglichst nur einigen, vielseitig verwendbaren Lösungsmittelgemischen auszukommen, da die Ergebnisse dann leichter vergleichbar sind und das häufig sehr geringfügige Untersuchungsmaterial sparsam verarbeitet wird. Im Institut für Gerichtliche Medizin, Erlangen, hat es sich als brauchbar erwiesen, bei der Ausmittelung von Schlaf- und Schmerzbekämpfungsmitteln für die Wanderung bei saurer Reaktion das Gemisch nach Jatzkewitz zu verwenden und für die Wanderung bei alkalischer Reaktion das erwähnte Butanol-Ammoniak-Wasser-Gemisch. Diese beiden Gemische haben sich für zahlreiche Substanzen, z.B. außer den sogenannten basischen Suchtmitteln (Jatzkewitz) für Pyramidon, Antipyrin und Ausscheidungsprodukte, Chinin, Brucin, Strychnin (Weinig und Schmidt) Persedon (Fabian) sowie einiger Lokalanästhetika bewährt.

2) Nach Abschluß unserer Untersuchungen konnten wir aus den neuen Mitteilungen von Raventoš entnehmen, daß der Autor sich bereits 1946 in unveröffentlichten Untersuchungen mit papierchromatographischen Methoden für Barbiturate und Thiobarbiturate befaßt hat und dabei auch unter anderem Grote's Reagens verwendet hat.

als freie Trapanalsäure identifiziert. Leitet man in eine wässrige Trapanallösung Kohlensäure ein, so erreicht man eine starke Fällung von ebenfalls freier Trapanalsäure. Daraus geht hervor, daß es die Kohlensäure der Luft ist, welche Trapanal bei längerem Stehen in wässrigen Lösungen verändert.

Zu einer Leberlösung, bestehend aus 200 g homogenisierter Leber, mit Wasser auf 2 Liter aufgefüllt, wurde 1 g Trapanal zugefügt und nach etwa drei Wochen untersucht. Die Leberlösung wurde angesäuert, mit Chloroform extrahiert und der auskristallisierte Rückstand sublimiert. Nach Sublimation- und Schmelzverhalten handelte es sich um Trapanal.

Nach diesem Ergebnis kann angenommen werden, daß Trapanal in fauligen Lösungen nicht verändert wird. Die aus dem Chloroformextrakt gewonnenen Kristalle gaben mit Zwickler's Reagens grüngelbe Färbung.

b) Versuche mit Harn nach Trapanal-Aufnahme

Als Untersuchungsgut zum Nachweis von Trapanal in Körperausscheidungen stand mir hauptsächlich Urin von Patienten zur Verfügung, die anlässlich einer Arteriographie mit Per-Abrodil eine Trapanal-Kurznarkose erhalten hatten, wobei meist 0,5 g Trapanal und 20-30 ccm des 60%igen Per-Abrodil verabreicht worden waren.

c) Per-Abrodil-Ausfällung

Zur Abtrennung des Per-Abrodil aus Trapanal-Per-Abrodil-Harnen wurde nach längeren Vorversuchen folgender Arbeitsgang für brauchbar befunden:

Die Harnprobe wurde mit konz. Salzsäure auf pH4 gebracht, wobei Per-Abrodil als voluminöser weißer Niederschlag ausfällt. Nach Trocknen des Niederschlags im Vakuum bei 37° weist man durch Glühen einer kleinen Substanzmenge im Schmelzröhrchen den an den violetten Dämpfen erkennbaren Jodgehalt nach.

Gibt man zu einer Probe einer 60%igen Per-Abrodil-Lösung Salzsäure, so tritt eine weiße Fällung ein. Die Sublimation des Niederschlages der Reinsubstanz und des Niederschlages aus dem Urin ergibt die gleichen Kristalle, was auch der gleiche Schmelzpunkt von 287-289° beweist. Kristallbild siehe Abb.2.



Abb.2

Es ist für ein intravenös anwendbares Kontrastmittel Voraussetzung, daß es unverändert und rasch ausgeschieden wird, was nach Haberstumpf für Per-Abrodil bewiesen ist. In der toxikologischen Literatur konnten über einen Nachweis von unverändert ausgeschiedenem Per-Abrodil aus dem Harn keine Angaben gefunden werden.

Die angeführten Nachweise beruhen auf der Freisetzung des Jods nach verschiedenen Methoden, welches dann quantitativ durch Titration mit Natriumthiosulfat bestimmt wird. (Nievegeld; Reuter 1936; Flox, Pitesky und Alving 1943; Bak, Brun und Raashou 1943.)

d) Extraktionsverfahren

Die nun erfolgende Ausmittelung des Trapanal-Umwandlungsproduktes wurde mit einer größeren Anzahl von Harnen durchgeführt, aus welchen Per-Abrodil durch Salzsäure-Fällung entfernt wurde. Zusätzlich standen noch einige Harne, die nur Trapanal und sein Umwandlungsprodukt enthielten, zur Verfügung.

Eine Urinmenge von 50-150 ccm wurde im Warmluftstrom eingeeengt, der Trockenrückstand in eine Perforierhülse gestrichen und im Soxhlet-Apparat über etwa 12 Stunden perforiert. Alkohol, Chloroform und Petroläther eigneten sich schlecht als Lösungsmittel; letzterer gab keine Ausbeute, bei den ersteren dagegen waren große Mengen von

Verunreinigungen vorhanden. Die besten Ergebnisse wurden mit Di- oder Trichloräthylen (nach Brodie mit geringem Amylalkoholzusatz) erzielt. Der verbleibende Extrakt wurde im Warmluftstrom eingengt.

e) Isolierung

In der bei der Einengung entstandenen Konzentration wurde der Rückstand sofort auf Chromatographierpapier aufgetragen; und zwar wurden je drei Startpunkte mit der gleichen Extraktlösung beschickt. Da sich bei den Untersuchungen mit reinem Trapanal das Butanol-Wasser-Ammoniak Gemisch (25:12,5:1) bewährte, wurde auch hier mit diesem Lösungsmittel nach der aufsteigenden Methode gearbeitet. Nach Erreichung einer Steighöhe von etwa 30 cm wurde das Chromatogramm getrocknet und in drei Streifen geschnitten.

f) Identifizierung

Die auf dem Chromatogramm getrennten Extraktbestandteile wurden wie folgt behandelt:

1. Streifen: Untersuchung im ultravioletten Licht
2. Streifen: Besprühen mit Grote's Lösung
3. Streifen: Besprühen mit einer gesättigten methyllalkoholischen Lösung von Cobaltnitrat und Aufdampfen von Morphin.

Alle chromatographischen Untersuchungen von Harnproben mit Per-Abrodil und Trapanal, nach Salzsäurefällung von Per-Abrodil und ohne Per-Abrodil-Verabreichung ergaben folgende Befunde:

Zu 1. Bei einem R_f -Wert zwischen 0,17 und 0,26 war im ultravioletten Licht eine kräftige Absorption zu erkennen. Bei R_f 0,37 fand sich eine schwache und bei R_f 0,67 eine sehr schwache Absorption (s.schematische Darstellung der Chromatogramme Abb.3).

Zu 2. Durch Besprühen mit Grote's Lösung entstand bei R_f 0,17-0,26 und bei R_f 0,37 eine kräftige hellrote Farbe. Bei R_f 0,67 trat keine Reaktion ein.

Zu 3. Bei den auf dem Chromatogramm mit Grote's Lösung reagierenden Stellen R_f 0,17-0,26 und R_f 0,37 erhielt man mit Cobaltnitrat eine rosaviolette Färbung, s.Abb.3.

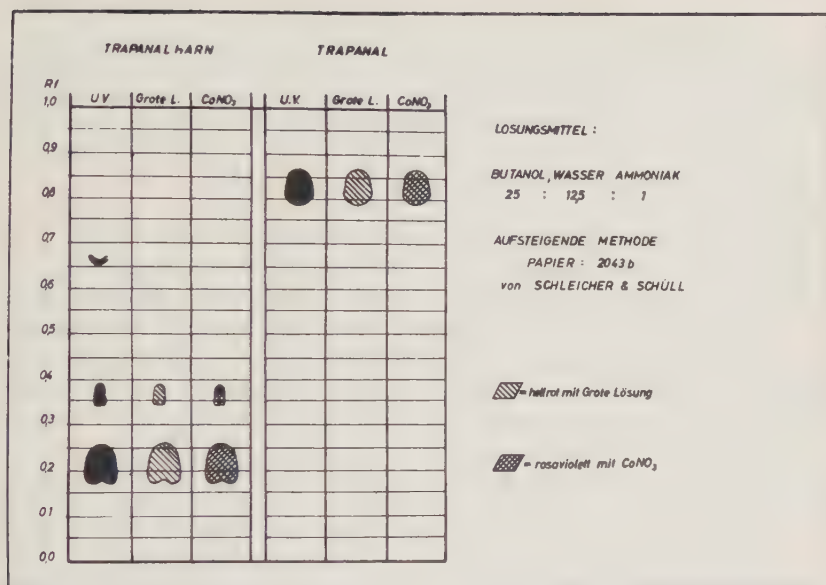


Abb.3

In vergleichsweise mit denselben Methoden untersuchten Leerharnen konnten derartige Substanzen nicht aufgefunden werden.

Diese Ergebnisse beweisen, daß eine Substanz in gut nachweisbaren Mengen im Harn auftritt, die ultraviolette Absorption zeigt, eine C-S-Bindung enthält und den Barbitursäurenachweis gibt. Unter den gewählten Bedingungen wanderte die Substanz auf dem Chromatogramm bis etwa R_f 0,26. Durch Besprühen mit Bromkresolpurpur als Indikator wurde die Säurenatur dieser Substanz bewiesen. Bei R_f 0,80-0,85, wo Trapanal erscheint, wurde bei keiner der Untersuchungen von Harn-extrakten eine Absorption, weder mit Grote's Lösung noch mit Cobalt-nitrat eine Reaktion gesehen. Trapanal wird also bei Gaben von 0,5 g nach unseren Feststellungen nur verändert aus dem Urin ausgeschieden.

Nach Eluierung der Substanz bei R_f 0,17-0,26 mit verdünnter Natronlauge ergab die spektrophotometrische Messung der Absorption die gleiche Kurve, wie sie von Brodie für Pentothal-Carboxylsäure angegeben wird. (s.Abb.1.) Nach Ansäuerung des Eluates mit Salzsäure wurde ebenfalls die von Brodie angegebene Kurve bestätigt. Bei der Substanz im Harn bei R_f 0,17-0,26 handelt es sich demnach um die von Brodie entdeckte Pentothal-Carboxylsäure.

Die Isolierung des gefundenen Umwandlungsproduktes wurde nach Extraktion mit Trichloräthylen aus mehreren Chromatogrammen im Soxhlet-Apparat und nochmaliger chromatographischer Reinigung erzielt. Nach dem Verdunsten des Trichloräthylens blieben Kristalle, kleine an den Enden aufgespaltene Prismen, mit mittlerer Doppelbrechung und gerader Auslöschung im polarisierten Licht zurück.

Sublimation der Pentothal-Carboxylsäure:

85° Tröpfchen, 90° Körnchen, 100° Auftreten von Stäbchen und zwitterförmigen Kristallen, die sich bei weiterer Sublimation zu größeren Stengeln auswachsen. (s.Abb.4.)



Abb.4

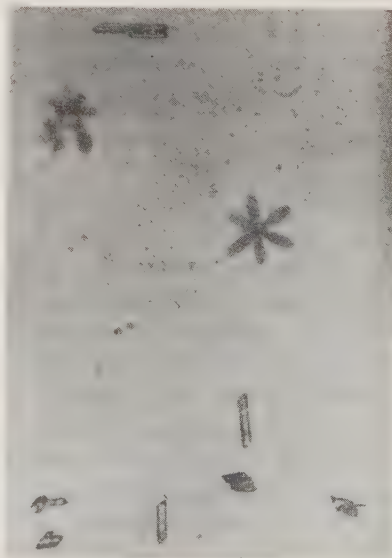


Abb.5

Der Schmelzpunkt liegt unscharf bei 179-192°.

Bei der polarisationsoptischen Untersuchung zeigte es sich, wie auch schon bei der Sublimation, daß zwei Modifikationen auftreten, wovon die eine aus schwach doppelbrechenden, gerade auslöschenden Stengeln mit schwalbenschwanzartigen Enden besteht, die bei 179-183° schmilzt. Sie bildet sich bei niedriger Temperatur in den Sublimaten, lagert sich aber bei höherer Temperatur zum größten Teil um in die zweite Modifikation. Diese schmilzt unter Zersetzung bei 190-192°, besteht aus stark doppelbrechenden Rauten mit gerader Auslöschung und Neigung zu Aggregatbildung.

Diese Substanz gab mit Zwikker's Reagens eine deutliche Gelbgrünfärbung. Rasch und leicht identifizierbar erwies sich die Pentothal-Carboxylsäure bei Anwendung der sog. Schwermetallkomplexreagentien nach Lüdy-Tenger; mit Wismutchlorjodid entwickelten sich nach einmaligem Erhitzen beim Wiederabkühlen zwei Arten von dunkelbraun gefärbten Komplexen. (s. Abb. 5)

Hiervon ist eine Art praktisch isotrop, d.h. nur ganz schwach doppelbrechend und bildet kastanienblattähnlich gewachsene Formen, die sich bald wieder auflösen. Die zweite ist stark doppelbrechend, bildet langsamer wachsende Rauten mit einem Winkel von 58° und besitzt eine Auslöschungsschiefe.

Über die pro Zeiteinheit ausgeschiedene Menge von Trapanal-Carboxylsäure kann aus zwei Gründen keine allgemein gültige Aussage gemacht werden. Als erstes war es uns nicht möglich, die Urinproduktion mehrerer Patienten während der Ausscheidungsphase lückenlos zu kontrollieren. Der andere Grund ist jedoch, daß den Patienten mit dem Trapanal gleichzeitig Per-Abrodil verabreicht wurde. Dies sind auch die Gründe, warum die zweite gefundene Stoffwechselsubstanz bei R_f 0,37 nicht genauer identifiziert werden konnte. Nach Dost werden bei verhältnismäßig großer Wassermenge nur wenig Stoffe neben Per-Abrodil ausgeschieden. Der von uns untersuchte Urin hatte eine auffallend blasse Farbe, was auf eine durch die hohe Per-Abrodil-Konzentration hervorgerufene Verschiebung der mengenmäßigen Ausscheidung harmpflichtiger Substanzen schließen läßt. Es ist daher naheliegend, daß auch die Trapanal-Ausscheidung weitgehend beeinflusst wurde.

Smith und Mitarbeiter berichten von Per-Abrodil, daß es mit die höchste je gefundene clearance aufweist. Bei geringem Blutspiegel erreicht der clearance-Wert dieses Kontrastmittels das Sechsfache der gleichzeitig ermittelten Inulin-clearance.

C. Epikrise

I. Auswertung der Ergebnisse

Mit unseren Untersuchungen erstrebten wir in erster Linie einen forensisch brauchbaren Trapanal-Nachweis aus dem Harn. Hierfür stand uns lediglich, abgesehen von mehreren Farbreaktionen für den organisch gebundenen Schwefel und für das Barbitursäureradikal die Angabe von Brodie und Mitarbeitern zur Verfügung, die Thiopental und Thiopental-Carboxylsäure spektrophotometrisch im ultravioletten Licht nachgewiesen haben. Dabei mußte jedoch die mangelnde Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Thiopental und Thiopental-Carboxylsäure stören, da beide durch die gleiche ultraviolette Absorptionskurve nachgewiesen werden.

Unter Verwendung der Extraktionstechnik von Brodie, jedoch bei Verwendung von luftgetrockneten Harnrückständen wurde eine papierchromatographische Methode ausgearbeitet. Diese ermöglichte Thiopental bzw. Trapanal und die daraus entstandene, mit dem Harn ausgeschiedene Trapanal-Carboxylsäure nebeneinander nachzuweisen. Es konnte sowohl mit Grote's Lösung der organisch gebundene Schwefel, mit Bodendorf's Reagens in der Modifikation von Pfeil, das Barbitursäureradikal, wie durch Spektrophotometrie im Eluat die charakteristische (von Brodie ermittelte) Extinktionskurve im ultravioletten Licht gemessen werden. Durch die chromatographische Trennung wurde eine so gute Reinigung durchgeführt, daß der Kurvenverlauf durch Fremdstoffe nicht verzerrt wurde. Das zweite gefundene Stoffwechselprodukt bei R_f 0,37 konnte wegen zu geringer Substanzmenge und zu geringer Ausscheidungsquote nicht identifiziert werden, es gibt jedoch Barbitur- und Thiobarbitursäurereaktion.

Diese Nachweismethode kann somit für forensisch-toxikologische Zwecke als brauchbar empfohlen werden. Vor allem konnte das Trapanal-Stoffwechselprodukt aus dem Harn isoliert werden und kristalloptisch nachgewiesen werden.

Auch die Anwendung der Schwermetallhalogen-Komplexreagentien ist zu empfehlen, da die Trapanal-Carboxylsäure charakteristisch geformte Komplexe, z.B. mit Wismutkaliumchlorjodid bildet.

Mit der angegebenen Methodik kann eine Trapanal-Aufnahme festgestellt werden, wenn der Harn innerhalb der ersten 24 Stunden in einer Menge von 50 - 100 ccm zur Verfügung steht. Die verabreichte Dosis betrug bei den von uns untersuchten Fällen jeweils 0,5 g.

Das Verhältnis der ausgeschiedenen Trapanal-Carboxylsäure zur aufgenommenen Trapanal-Menge in mengenmäßiger Hinsicht konnte von uns nicht eindeutig ermittelt werden. Es dürfte sich in den ersten 24 Stunden um mehrere Prozent handeln.

II. Zusammenfassung

Es wird über eine spezifische Methode zum Nachweis der Ausscheidungsprodukte von Trapanal im Harn berichtet. Die aufsteigende papierchromatographische Methode ermöglicht es, das Stoffwechselprodukt von Pentothal bzw. Trapanal, die Pentothal-Carboxylsäure, die zuerst von Brodie dargestellt wurde und ein weiteres nicht identifiziertes Ausscheidungsprodukt nachzuweisen. Nach Brodie geschieht der Nachweis auf spektrophotometrischem Wege, wobei Pentothal und Pentothal-Carboxylsäure etwa die gleiche Absorptionskurve im ultravioletten Licht aufweisen. Ein chromatographischer Nachweis ist erfolgversprechend, wenn mindestens 0,5 g Trapnal verabreicht wurden und 50-100 ccm Harn aus der ersten 24 Stundenmenge zur Verfügung stehen.

Die polarisationsoptischen Untersuchungen und die Mikrophotographien wurden mit einer von der deutschen Forschungsgemeinschaft in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellten Apparatur (Standard Polarisationsmikroskop mit Mikroaufsatzkamera von der Firma Zeiß-Winkel) durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Arbeit möchte ich hiermit Herrn Professor Dr.Dr.E.Weinig herzlich danken.

Bei Herrn Dr.G.Schmidt bedanke ich mich herzlich für die Anregungen zu dem Thema und die Förderung bei der Durchführung der Arbeit.

L i t e r a t u r a n g a b e n

- Awe, W.: Über den Nachweis von zweiwertigem Schwefel in organischen Arzneimitteln. Pharmazie 11, 492 (1948)
- Bak, B., Brun, C., u. R. Flemming: Die Bestimmung von Per-Abrodil in Plasma und Harn. Chem. Zbl. 2a, 937 (1943)
- Bodendorf, K.: Arch. Pharm. 270, 290 (1932)
- Bollmann, I. S., Brooks, L. M., Flock, E. V. u. I. S. Lundy: Die Verteilung von einmalig gegebenem Pentothal-Na und S³⁵ Thiopental in den Geweben. Anesthesiologie 11, 1:1 (1950)
- Brodie, B. B., Mark, L., Papper, E. M., Lief, P. A., Bernstein, E. u. E. A. Rovenstine: The Fate of Thiopental in Man and a Method for its Estimation in Biological Material. J. Pharm. a. Exper. Therap. 98, 85 (1950)
- Brodie, B. B., Bernstein, E. and L. C. Mark: The Role of Body Fat in Limiting the Duration of Action of Thiopental. J. Pharm. 105, 421 (1952)
- Brodie, B. B.: Physiological Disposition and Chemical Fate of Thiobarbiturates in the Body. Federation-Proceedings, 2, 2 (1952)
- Buchel, L. et J. Lévy: Durée de la Présence des Barbituriques dans L'Organisme. J. Physiologie, 42, 127-142 (1950)
- Bush, M. u. T. Butler: Federation-Proceedings 6, 313 (1947)
- Dost, F. H.: Der Blutspiegel. Georg Thieme, Leipzig (1953)
- Enders, A. u. F. R. Körner: Die Beeinflussung der Leberschädigung bei chronischen Thiopental-Vergiftungen durch methioninsaures Cholin. (1952) Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 215, 177
- Esposito Vitolo, A.: Boll. chim. farm., 89, 351-360 (1950)
- Fabian, F.: Inaug.-Diss. Erlangen 1954
- Fahr, W.: Inaug.-Diss. Erlangen 1954
- Fischer, E. u. I. V. Mering: Über eine neue Klasse von Schlafmitteln. Therapie der Gegenwart, 44, 100 (1903)
- Flox, J., Pitesky, I., u. S. Alving: Chem. Zbl. 1a, 869 (1943)
- Gad, I.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmakol. 199, 499 (42)

- Goldbaum, R.: An Improved Ultraviolet Spectrophotometric Procedure For The Determination and Differentiation Of Barbiturates. Federation-Proceedings, 10, 299 (1951)
- Gould, T.C. and F.E. Shideman: Further Studies On In Vitro Metabolism Of Thiopental. Federation-Proceedings, 10, 299 (1951)
- Grote, I.W.: J.Biol. Chem 93, 25 (1931)
- Haberstumpf, H.: Inaug.-Diss. München 1945
- Heise, E. u. H. Kimbel: Nachweis und quantitative Bestimmung von Thiobarbitursäurederivaten. Arzneim.-Forsch. 5, 149-151 (1955)
- Hoffmann, W. u. G. Wilkens: Zum Nachweis des Schwefels in schwefelhaltigen organischen Arzneimitteln. Pharmazie 2, 396 (1947)
- Jailer, J.W. u. L.R. Gouldbaum: Studies on The Plasma Concentration and Tissue Distribution of Sodium-Pentothal. J.Labor. and Clin.Med. 31, 1344 (1946)
- Jatzkewitz, H.: Hoppe-Seylers z. 292, 94 (1953)
- Keele, C.A.: Distribution and Fate of Anesthetic Drugs. Der Anästhesist, 1, 2, 64 (1952)
- Körner, F.R.: Die Wirkung von Sulfonamiden u. von Penicillin auf die Toxizität einiger intravenöser Narkosemittel. Der Anästhesist, 1, 2, 70-73 (1952)
- Kozelka, F.L. u. C. Hine: J. of Pharm.a.exper.Ther. 66, 20 (1939)
- Lüdeke, H.: Erfahrungen mit dem Narkotikum Pentothal-Na. Dtsch. Med. Wschr. 2, 77 (1951)
- Lüdy-Tenger, F.: Einige mikrochemische Identitätsreaktionen für die pharmazeutische Praxis. Pharm.Acta Helvetica, 2, 385 (1944)
- Mohrschulz, W.: Südd. Apoth. Z., 90, 377 (1950)
- Nievegeld, J.H.C.: Quantitative Bestimmung von Kontrastmitteln im Urin. Pharm.Weekbl., 69, 1422-25
- Oettel, F.: Arch.d.Pharm., 2, 247 (1936)
- Palmieri, V. u. Romano: La chromatographic de partage sur papieren médecine légale.
- Pfeil, E.: Klin.Wschr. 42, 1011 (1953)

- Raventos, J.: The Distribution in the Body and Metabolic Fate of Barbiturates. J.of Pharmacy a. Pharmacol. 6, 232 (1954)
- Reuter: Per-Abrodil und sein Nachweis im Blut. Pharm.Ztg. 95, 1273 (1936)
- Roux, A.: Ann.Pharm.Franc., 107, (1948)
- Shideman, F.E., Kelly A.R.u.B.J.Adams: The Role Of The Liver In The Detoxification Of Thiopental and Two Other Thiobarbiturates. J.Pharm.a.exper.Therap. 91, 331 (1947)
- Sonsbeek van, I.I.M. The Grote Reagent. Acta Pharm.Intern. 1, 43-38 (1950)
- Tabern, D.L. and E.H.Volwiler Sulfur-Containing Barbiturate Hypnotics. J.of the Amerc.Chem.Society, 57, 10, 1961 (1935)
- Taylor, I.D., Richards R.K. u. D.L.Tabern: Metabolism of Thiopental. J.Pharm.a.exper.Therap. 104, 93 (1952)
- Turkevich, N.M.u. M.D.Makukha: Alkaline Hydrolysis Of Thiazolidine, And Its Analytical Application. Zhur. Anal.Khim., 6, 308-16 (1951)
- Walton, C.H., Saldamando, J. u. W.M.Egner: The Effect Of Intravenous Pentothal-Sodium with Or Without Inhalation Of Oxygen On Liver Function. Anesthesiology 12, 1. (1951)
- Weinig, E. u. G.Schmidt: Über die Ausscheidung von Arzneimitteln im Schweiß und deren Nachweis in Körperwäsche. Kriminalwissenschaft 2, (1954)
- Wojahn, H.: Zur quantitativen Bestimmung der Thiobarbitursäuren. Arch.d.Pharm. 1, 1 (1955)
- Zwikker, J.J.L.: Pharm.Weekbl. 68, 975 (1930)
- Zwikker, J.J.L.: Pharm.Weekbl. 69, 1178 (1931)

Lebenslauf

Am 5. September 1928 wurde ich, Brigitte, Romana Arold als drittes Kind der Verwaltungs-Inspektors-Eheleute Adam Arold und seiner Ehefrau Christiane geb. Kaupert in Nürnberg geboren. Ab April 1935 besuchte ich die Volksschule und trat im April 1939 in die Oberrealschule für Mädchen über, die ich 1948 mit Erfolg absolvierte.

Bis Beginn des Studiums im Sommer-Semester 1950 an der Universität Erlangen leistete ich den hierzu vorgeschriebenen Krankenpflegedienst und führte, da meine Mutter 1945 verstorben ist, den väterlichen Haushalt. Mein Vater starb unerwartet im Januar 1953.

Die ärztliche Vorprüfung legte ich im Oktober 1952 an der Universität Erlangen ab und beendete das Studium mit der ärztlichen Prüfung während des Winter-Semesters 1955/56.

In der Zeit vom Oktober 1954 bis April 1955 arbeitete ich an der Dissertation im Institut für Gerichtliche Medizin an der Universität Erlangen.

